第 2 卷第 4 期增刊 动 物 学 研 究 Vol.2, No.4
1981年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1981

中华眼镜蛇细胞毒素晶体生长的研究

林政炯 桂璐璐 梁丽 董北 滕脉坤 龚海韵
(中国科学院生物物理研究所)

杜雨苍 吴文玉 吴翠蓉
(中国科学院上海生物化学研究所)

摘 要

为了用X射线衍射方法测定细胞毒素的三维结构，我们尝试了生长适合于X射线工作的单晶体，用气相扩散方法得到了中华眼镜蛇细胞毒素的两种成分的四种晶型。

晶体X射线衍射已证明是目前研究蛋白质空间结构的最有效方法。廿多年来，它所提供的丰富的结构资料，大大加深了人们对蛋白质性质的了解。目前神经毒素的晶体结构已有报道[1～3]，但细胞毒素的晶体结构研究开展得很少，至今尚未得到一个结构分析结果。因此，测定细胞毒素的晶体结构，以帮助阐明这类毒蛋白的结构与功能关系是很有意义的。作X射线衍射用的样品，必须是足够大（线度为 1 mm左右）的大单晶，生长出合用的大单晶是测定蛋白质晶体结构的首要的步骤。两年来，我们对中华眼镜蛇细胞毒素的晶体生长条件进行了探索。中华眼镜蛇毒经SP-Sephadex C-25 柱层析分离得到细胞毒素的四种成分[4]，其中有两种已培养成晶体。

采用我们实验室发展起来的一种微量气相扩散方法进行眼镜蛇细胞毒素晶体生长的研究。其方法是用直径为 8～10cm 硅化过的圆形康维皿及方形盖玻璃，接触面涂以真空油密封，构成封闭体系。（见图 1 微量气相扩散法装置）。康维皿内槽放置含有蛋白质和沉淀剂的缓冲液滴，外槽放置不含蛋白质而沉淀剂浓度稍高的缓冲液，内外液通过气相扩散达到平衡。适当调节沉淀剂浓度、pH值和蛋白质浓度……等，可以探寻晶体生长的最佳条件。这方法的优点是；操作简便，所需蛋白质量少，适合于微量蛋白质晶体的生长和便于在显微镜下观察和筛选晶体生长条件。

一、中华眼镜蛇细胞毒素成分——CDⅣ

得到了菱形和长板形两种晶形的晶体。图 2 和图 3 给出了 CDⅣ 菱形晶体和长板形晶体的照片。

CD_{IV}菱形晶体和CD_{IV}长板形晶体的生长条件列于表1。

表1　CD_{IV}晶体生长条件

编　　号	CD_{IV}	CD_{IV}
蛋白质浓度	4 mg/ml	4 mg/ml
缓冲体系	磷酸缓冲液	Tris—HCl 缓冲液
沉淀剂	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$
晶　　形	菱形晶体	长板形晶体

晶体生长时的温度保持在23°C，几天至一个月后出现菱形晶体，最大的晶体大小约$0.3\times0.3\times0.1mm^3$，易孪生，多数晶体的棱角不分明，呈“眼睛形”。$CD_{IV}$可进一步分离成两个成分$CD_{IV(1)}$和$CD_{IV(2)}$。最新实验指出上述晶体属于$CD_{IV(1)}$成分。

长板形晶体是在23°C条件下放置几天后出现的，重复性较好。

二、中华眼镜蛇细胞毒素成分——CT_{14}

得到了六角形和菱形十二面体形两种晶形的晶体。图4和图5给出了CT_{14}六角形晶体的照片。可以看出晶体具有规则的六角形外形，从图5还可以看到它有一定的厚度。图6和图7是CT_{14}菱形十二面体形晶体照片，图6所表示的晶体外形接近于理想的菱形十二面体外形。

CT_{14}六角形晶体和CT_{14}菱形十二面体形晶体的生长条件列于表2。

表2　CT_{14}晶体生长条件

编　　号	CT14	CT14
蛋白质浓度	4 mg/ml	4 mg/ml
缓冲体系	Tris—HCl 缓冲液	磷酸缓冲液
沉淀剂	$(NH_4)_2SO_4$	NaCl
晶　　形	六角形晶体	菱形十二面晶体

CT_{14}六角形晶体是在23°C条件下10天后出现的，晶体外形规则、透明，重复性较好。

CT_{14}菱形十二面体形晶体是在23°C条件下一周后出现的，晶体外形规则，最大晶体大小约$0.8\times0.5\times0.3mm^3$。

眼镜蛇细胞毒素的几种成分在氨基酸组成和一级结构上略有差异[4]。但结晶行为却不一样。CD_{IV}和CT_{14}容易长出晶体，其它成分则不容易，长出的结晶形状也有差别。此项研究还表明，细胞毒素和多数别的蛋白质一样，在不同的结晶条件下会得到不同的晶型，具有“多晶型”现象。

晶体对X射线的衍射能力和初步晶体学参数的鉴定工作正在进行中。

志谢：本所雷克健同志给予了本项研究许多帮助，并提出过有益的建议，特此表示感谢。

参 考 文 献

〔1〕Low,B.W.1979 *Handbook of Experimental Pharmacology*. 52, chap. 6. Springer-Verlag, Berlin.

〔2〕Walkinshaw M.D.,Saenger W.,and Maelicke A.Three-dimensional structure of the "long" neurotoxin from cobra venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 2400.

〔3〕Tsernoglou, D., and Petsko, G. A. 1977. Three-dimensional Structure of neurotoxin a from venom of the philippines sea snaae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

〔4〕Du Yu-cang et al. Nucleic Acid and Proteins. *Proc.Symp. Nucleic acid proteins*.1980,P163-168, Science Press, Beijing, China.

THE STUDIES ON CRYSTALLIZATION OF CYTOTOXIN FROM CHINESE COBRA(NAJA NAJA ATRA)VENOM

Lin Zheng-jiong Gui Lu-lu Liang Li
Dong Bei *Teng Mai-kun Gong Hai-yun
(Institute of Biophysics, Academia Sinica)

Du Yu-cang Wu Wen-yu Wu Cui-rong
(Shanghai Institute of Biochemistry,Academia Sinica)

Abstract

In order to determine the 3-dimensional structure ot cytotoxin by X-ray diffraction. We have tried to growth single crystals of cytotoxin suitable for X-ray work. Four crystal forms from two cytotoxin components(*Naja Naja Atra*) have been obtained by vapour diffusion method.

* China University of Science and Technology.